



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07300426 A**(43) Date of publication of application: **14.11.95**

(51) Int. Cl

**A61K 38/22**  
**A61K 38/22**  
**A61K 38/22**  
**A61K 38/22**  
**A61K 38/22**  
**A61K 38/22**  
**C07K 1/16**  
**C07K 14/52**

(21) Application number: **06114372**(22) Date of filing: **28.04.94**

(71) Applicant: **NAKAMURA TOSHIICHI SNOW  
 BRAND MILK PROD CO LTD  
 SUMITOMO PHARMACEUT CO  
 LTD**

(72) Inventor: **NAKAMURA TOSHIICHI  
 SHIODA AKIRA  
 FUJISE NOBUAKI  
 NAMIKI MITSUO**

**(54) COLLAGEN DECOMPOSITION PROMOTER****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a collagen decomposition promoter capable of inducing decomposition of the collagen matrix of a connective tissue excessively accumulated in the tissue and useful for therapy of fibrosis diseases.

**CONSTITUTION:** This collagen decomposition promoter contains one or more kinds of HGFs (hepatocyte growth factor) as the active components. As the HGFs, e.g. HGF is used. HGF can be obtained by extracting an organ, hemocyte, plasma, serum, etc., of a mammal and purifying it or by culturing a primary culture cell or an established cell respectively producing HGF and conducting separation and purification from the products or by a gene engineering technique. The HGFs have a therapeutic effect on fibrosis diseases including arterial sclerosis, chronic glomerular nephritis, dermal keloplasty, progressive systemic sclerosis, fibroid lung, hepatic

fibrosis, cystic fibrosis, chronic graft versus host diseases, hidebound diseases (local or systemic), Peyronie's disease, penile fibrosis, urethrostenosis after cystoscopy, internal adhesion after surgical operation, myelofibrosis and idiopathic retroperitoneal fibrosis.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-300426

(43) 公開日 平成7年(1995)11月14日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/22	ABX ABJ ACD		A 6 1 K 37/ 24	ABX ABJ
審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 10 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-114372

(22) 出願日 平成6年(1994)4月28日

(71) 出願人 591115073

中村 敏一

大阪府高槻市高見台10-27

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 中村 敏一

大阪府高槻市高見台10-27

(74) 代理人 弁理士 廣瀬 孝美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン分解促進剤

(57) 【要約】

【目的】 線維症障害の治療に有用なコラーゲン分解促進剤及び線維症障害治療剤を提供することを目的とする。

【構成】 本発明のコラーゲン分解促進剤及び線維症障害治療剤は、それぞれHGF (Hepatocyte Growth Factor, 肝細胞増殖因子) 類を有効成分として含有することからなる。有効成分であるHGF類は、コラーゲンの分解(コラゲナーゼ活性の増加)を促進する作用を有しており、線維症障害を有効に治療することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 HGF類の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とするコラーゲン分解促進剤。

【請求項2】 HGF類として、HGFを含有する請求項1記載のコラーゲン分解促進剤。

【請求項3】 HGF類の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする線維症障害治療剤。

【請求項4】 上記線維症障害が、動脈硬化、慢性糸球体腎炎、皮膚ケロイド生成、進行性全身性硬化症（PSS）、肝線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、慢性の対宿主移植片疾患、硬皮症（局部及び全身）、ペイロニー氏病、陰茎の線維症、膀胱鏡検査後の尿道狭窄症、外科手術後の内部癒着、骨髄線維症及び特発性後部腹膜線維症からなる群から選ばれることを特徴とする請求項3記載の線維症障害治療剤。

【請求項5】 HGF類として、HGFを含有する請求項3又は4記載の線維症障害治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、コラーゲン分解促進剤及び線維症障害治療剤に関する。より詳細には、HGF (Hepatocyte Growth Factor)類を有効成分としたコラーゲン分解促進剤及び線維症障害治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】線維症とは、結合組織成分の過度の蓄積で特徴づけられる疾患であり、線維症においてその中心をなし最も注目すべきものはコラーゲンである。コラーゲンの蓄積は種々の臓器で生じ、例えば、肺においては肺線維症、肝臓においては肝線維症のような病態で生じる。また、皮膚においても、例えば、皮膚ケロイド生成のような病態で生じる。多くの場合、線維症におけるコラーゲンの正味の蓄積は、コラーゲンの生産及び分解を起す因子の間の不均衡の結果である。線維症の疾患及び障害を治療するために種々の投薬法が行われてきたが、一般にそれらは障害の対症療法が中心であり、そのもとである病理すなわちコラーゲンその他の結合組織成分の生産及び分解を調節する代謝因子のなかの不均衡を解消することを目指したものではなかった。それゆえ、これらの治療法のなかには、組織の改善という点で特に有効とされるものはなかった。すなわち、例えば、皮膚ケロイド生成の初期の炎症段階を治療するのに局部コルチコステロイドが使用されて或程度成功したが、過度のコラーゲン生産の結果としてケロイドが実際に生成した場合のような後期の線維症の段階ではそのようなステロイドは殆ど又は全く効果がない。このように、従来技術では、安全で有効な方法でヒトの線維症障害を治療して、それ以上の線維症の組織の生成を阻止し、既に生成している線維症の病巣を減少させ又は完全に除去するような方法は見出せなかった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、組織内における過度に蓄積された結合性組織のコラーゲンマトリックスの分解を誘導することのできるコラーゲン分解促進剤及び線維症障害の治療に有用な治療剤を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記の課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、HGF類がコラーゲンの分解を促進する作用を有し、その作用に基づき線維症障害の治療に有効であることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、HGF類の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とするコラーゲン分解促進剤；HGF類の少なくとも一種を有効成分として含有することを特徴とする線維症障害治療剤；に関する。

【0005】本発明において、HGF類とは、肝細胞増殖活性を示す蛋白質をいい、例えば、HGF (Hepatocyte Growth Factor)などが挙げられる。本発明で使用されるHGF類としては、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができる。HGFの調製方法としては、各種の方法が知られている。例えば、ラット、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髄、脳、腎臓、胎盤等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる (FEB S Letters, 224, 312, 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5844, 1989など参照)。また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物（培養上清、培養細胞等）から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる (例えば、Nature, 342, 440, 1989; Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967, 1989など参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

【0006】より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば、ラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出して粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC等の通常の蛋白質精製法にて精製することができる。また、遺伝子組換え法を用い、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を、ウシパピローマウィルスDNAなどのベクターに組み込んだ発現ベクターによって動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、マ

ウスC127細胞、サルCOS細胞などを形質転換し、その培養上清より得ることができる。

【0007】かくして得られたHGF類は、HGF類と実質的に同効である限り、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び／又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖鎖が同様に欠失又は置換されていたりしてもよい。

【0008】本発明のコラーゲン分解促進剤は上記のHGF類を有効成分とし、HGF類は後記試験例に示されるように、コラーゲンの分解（コラゲナーゼ活性の増加）を促進する作用を有する。従って、下記の線維症障害の治療の他、その予防にも有用であり、またコラゲナーゼ活性が低下した疾患、例えば、大理石骨病などの治療・予防に有用である。また、本発明の線維症障害治療剤は、同様に上記のHGF類を有効成分とし、コラーゲン、フィブロネクチン及びグリコサミノグリカン（GAG）を含む結合性組織マトリックスの過度の線維芽細胞生産によって特徴づけられる線維症障害の治療に有用である。これには下記の障害が含まれる。

【0009】動脈硬化、慢性糸球体腎炎、皮膚ケロイド生成、進行性全身性硬化症（PSS）、肝線維症、肺線維症、嚢胞性線維症、慢性の対宿主移植片疾患、硬皮症（局部及び全身）、ペイロニー氏病、陰茎の線維症、膀胱鏡検査後の尿道狭窄症、外科手術後の内部癒着、骨髄線維症、特発性後部腹膜線維症

【0010】本発明のコラーゲン分解促進剤及び線維症障害治療剤は、ヒトの他、哺乳動物（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ等）におけるコラーゲン分解促進及び線維症障害治療に適用される。

【0011】本発明のコラーゲン分解促進剤及び線維症障害治療剤は種々の製剤形態（例えば、液剤、固形剤、カプセル剤等）をとりうるが、一般的には有効成分であるHGF類のみ又はそれと慣用の担体と共に注射剤、吸入剤、坐剤又は経口剤とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、HGF類を適切な溶剤（例えば、滅菌された水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中のHGF類含量としては、通常0.0002～0.2（W/V%）程度、好ましくは0.001～0.1（W/V%）程度に調整される。また、経口薬としては、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、軟又は硬カプセル剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤などの剤形に製剤化され、これらの製剤は製剤化の常法に準じて調製することができる。坐剤も慣用の基剤（例えば、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチン、マクロゴール、ウィテップゾル等）を用いた製剤上の常法によって調製することができる。また、吸入剤も製剤上の常套手段に準じて調製することができる。製剤中のHGF類含量は、剤形、適用疾患などに応

じて適宜調整することができる。

【0012】製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、グリシン、マンニトール、グルコース、デキストラン、ソルビトール、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでいてもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。

【0013】本発明のコラーゲン分解促進剤及び線維症障害治療剤は、その製剤形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与することができる。その投与量は、患者の症状、年齢、体重などにより適宜調整されるが、通常HGF類として0.05mg～500mg、好ましくは1mg～100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

#### 20 【0014】

【発明の効果】本発明の有効成分であるHGF類は、コラーゲンの分解（コラゲナーゼ活性の増加）を促進し、もって線維症障害を有効に治療することができる。

#### 【0015】

【実施例】以下、製造例及び実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

#### 製造例1

#### HGF製剤の生産例

- 30 (1) HGF 20  $\mu$ g  
ヒト血清アルブミン 100mg  
上記物質をpH7.0の0.01MのPBSで溶解し、全量を20mlに調製し、滅菌後、バイアル瓶に2mlずつ分注し、凍結乾燥密封した。
- (2) HGF 40  $\mu$ g  
ツイーン80 1mg  
ヒト血清アルブミン 100mg  
上記物質を注射用生理食塩水に溶解し、全量を20mlに調製し、滅菌後、バイアル瓶に2mlずつ分注し、凍結乾燥密封した。

#### 40 【0016】実施例1

#### ジメチルニトロサミン肝線維化ラットに対するHGFの線維化抑制作用と症状改善効果

#### 1. 試験方法

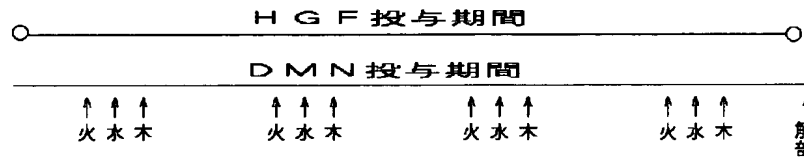
使用動物：ウィスター系雄ラット、5週齢

#### 試験スケジュール

ジメチルニトロサミン（DMN）を毎週火、水、木曜日に10  $\mu$ l/kgの用量で4週にわたり腹腔内投与した。HGFはDMN初回投与時より500  $\mu$ g/kgを1日2回（1000  $\mu$ g/kg/日）28日間静脈内投

与した(下記投与スケジュール1参照)。29日目に試験 \* 【0017】  
ラットを下記の測定に供した。 \*

### 投与スケジュール1



#### 【0018】測定

ラットを解剖して肝重量を測定した。また、肝組織中のヒドロキシプロリン含量(Hyp;線維化の指標)及びコラゲナーゼ(コラーゲン分解酵素)活性を、それぞれKivirikoらの方法(Anal. Biochem, 19, 249, 1967)及びMurawakiらの方法(J. Biochem, 108, 241, 1990)により測定した。更に、肝組織中のDNA及び蛋白含量は、それぞれDishe法のBurtonによる変法(Biochem, J, 62, 315, 1956)及びプロテインアッセイキット(パイオラット社製)により測定した。その結果を表1に示す。また、同時に後大静脈より採血し、採取した血清の臨床生化学検査は日立7150型自動分析装置により分析した。血液検査は、 ※20

※後大静脈より採取したEDTA加血液で血小板数、白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度を多項目自動血球計数装置(E-4000, Sysmex)を用いて測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウム水溶液と後大静脈より採取した血液を1:9の割合で混合した血漿で、血漿凝固能(プロトロンビン時間、フィブリノーゲン量、ヘパプラスチンテストとトロンボテストによる凝固時間)を自動凝固能測定装置(KC-40)を用いて測定した。その結果を表2に示す。

#### 【0019】

#### 【表1】

表1

	溶媒投与群	HGF投与群	健常動物
肝重量(g)	9.33±0.72	13.02±0.53 **	13.59±0.51 **
総DNA量(ng/肝臓)	33.6±2.5	39.3±1.8 *	44.8±1.7 **
総蛋白量(g/肝臓)	1.36±0.12	1.84±0.09 **	2.33±0.09 **
コラゲナーゼ活性 (μg/min/g-肝臓)	0.22±0.01	0.36±0.07 **	0.27±0.02
ヒドロキシプロリン含量 (μg/g-肝臓)	423.1±35.9	300.1±18.0 **	129.3±6.4 **

平均値±標準誤差 (n=10)

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01 溶媒投与群との有意差

#### 【0020】

#### 【表2】

表 2

血 液 生 化 学 検 査 値	溶媒投与群	HGF投与群	健常動物
GOT (IU/l)	136±9	78±4 **	64±3 **
GPT (IU/l)	50±4	28±1 **	15±1 **
γ-GTP (IU/l)	4.8±0.4	3.4±0.2 **	1.8±0.1 **
総ビリルビン (mg/dl)	0.45±0.08	0.25±0.01 **	0.18±0.01 **
直接型ビリルビン (mg/dl)	0.20±0.02	0.18±0.00	0.13±0.01 **
総蛋白 (g/dl)	4.9±0.1	6.4±0.1 **	5.7±0.0 **
アルブミン (g/dl)	2.4±0.1	3.1±0.1 **	2.6±0.0 **
血糖値 (mg/dl)	131±4	152±6 **	180±8 **
総コレステロール (mg/dl)	53±2	98±5 **	72±3 **
LDL-コレステロール (mg/dl)	28.0±1.9	61.6±3.8 **	41.3±1.7 **
トリグリセリド (mg/dl)	70±9	152±16 **	157±16 **
リン脂質 (mg/dl)	116±4	208±8 **	160±5 **
βリポ蛋白 (mg/dl)	107±11	222±20 **	202±18 **
血 液 ・ 凝 固 検 査 値	溶媒投与群	HGF投与群	健常動物
血小板数 (10 <sup>4</sup> /μl)	31±5	78±4 **	105±5 **
白血球数 (10 <sup>3</sup> /μl)	144±6	101±8 **	87±8 **
赤血球数 (10 <sup>6</sup> /μl)	667±16	702±9 **	755±6 **
ヘマトクリット値 (%)	39.9±0.9	41.6±0.3 *	44.3±0.3 **
ヘモグロビン濃度 (g/dl)	12.7±0.3	13.6±0.1 **	14.6±0.1 **
プロトロンビン時間 (sec)	15.6±0.5	13.8±0.2 *	13.8±0.2 *
フィブリノーゲン (g/dl)	1.45±0.10	2.05±0.11 **	2.31±0.05 **
ヘパプラスチン時間 (sec)	37.3±2.7	28.6±0.6 **	28.5±0.5 **
トロンボテスト時間 (sec)	30.0±1.9	22.5±0.3 **	22.8±0.3 **

平均値±標準誤差 (n=10)

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 溶媒投与群との有意差

## 【0021】2. 結果

表1及び表2に示すように、DMNの反復投与により、溶媒投与群（対照）では顕著な肝の線維化の伸展と萎縮が観察され、臨床生化学、血液及び凝固系検査値から明らかな肝機能の低下が認められた。これに対し、HGF投与群の肝機能検査値は溶媒投与群のそれらの値より有意な差で健常動物に近い値を示し、明らかな改善効果を示していた。また、HGF投与により肝組織中のDNA、蛋白量、コラゲナーゼ活性が有意に上昇し、線維化の指標であるヒドロキシプロリン含量は有意に低下し、肝重量はほぼ正常レベルまで回復した。

## 【0022】実施例2

## 四塩化炭素肝線維化ラットに対するHGFの作用

ウィスター系雄ラット（6週齢）に四塩化炭素を毎週月、木曜日に0.7ml/kgの用量で12週間経口投与 \*

\* 与して肝線維化モデルを作成した。この四塩化炭素肝線維化ラットを下記の2つの試験に供した。

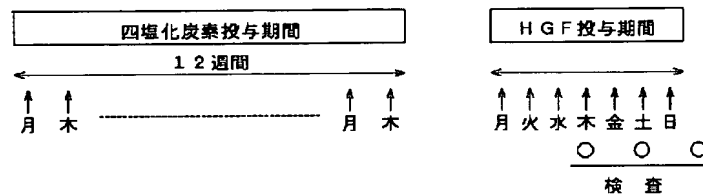
## 【0023】試験A

## 反復投与試験

上記の四塩化炭素肝線維化ラット（1群13～14匹）に、HGFを50及び500μg/kgで1日2回（100及び1000μg/kg/日）7日間静脈内投与した。HGF投与開始から3、5、7日目の血清中のGOT、GPT、γ-GTP値の変化を溶媒投与群（対照）と比較した（下記投与スケジュール2参照）。その結果を図1に示す。図1に示されるように、1000μg/kg/日で5日目、100μg/kg/日で7日目から回復促進作用が認められた。

## 【0024】

## 投与スケジュール2



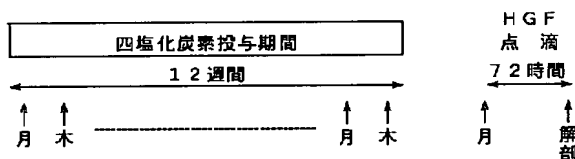
## 【0025】試験B

## 点滴注入試験

各群12~13匹の上記四塩化炭素肝線維化ラットを用い、頸静脈に留置したカテーテルより、HGFを100及び1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の割合で持続点滴注入し、HGF投与開始から72時間後に解剖した(下記投与スケジュール3参照)。

## 【0026】

## 投与スケジュール3



\*【0027】血清中のGOT、GPT、血清総蛋白、アルブミンは日立7150型自動分析装置により、3.8%クエン酸ナトリウム水溶液と後大静脈より採取した血液を1:9の割合で混合した血漿の凝固能については、ヘパラスチンテストの凝固時間を自動凝固能測定装置(KC-40)で測定した。また、線維化の指標として肝組織中ヒドロキシプロリン含量(Hyp)は、前掲のKivirikkoらの方法により測定した。その結果を表3及び図2に示す。表3及び図2に示されるように、HGFは100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以上で用量に依存した肝機能検査値の改善、低蛋白血症の回復及び線維化の改善を示唆する肝組織中ヒドロキシプロリン含量の低下が観察された。

## 【0028】

## 【表3】

表3

	総蛋白量 (g/dl)	アルブミン量 (g/dl)
溶媒投与群	5.0 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1
HGF投与群(100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ )	5.5 $\pm$ 0.2 *	2.1 $\pm$ 0.1 *
HGF投与群(1000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ )	5.7 $\pm$ 0.2 **	2.1 $\pm$ 0.1 *
健常動物	6.0 $\pm$ 0.1 **	2.4 $\pm$ 0.03 **

平均値  $\pm$  標準偏差 (n = 12 ~ 13)

\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  溶媒投与群との有意差

## 【0029】実施例3

## DMNによって惹起されたラット肝線維化とそれに伴う肝機能不全に対するHGFの効果

## 試験A

DMNによって惹起された肝線維化ラットに対するHGF投与群及び非投与群における生存率を試験した。薬剤の投与スケジュールを図3の上方に示す。生理食塩水に1%の濃度で溶解したDMNを、SD系雄性ラットの体重1kgあたりDMNとして10  $\mu\text{l}$ の割合で、1週間に3回つづ6週間矢印で示した日に腹腔内投与した。ヒトHGF又は生理食塩液は、DMN投与開始後21日目よりハッチングした帯で示した期間毎日静脈内投与し、試験ラットの生存率(%)を経日的に調べた。その結果を図3に示す。図3において、点線は生理食塩液投与群(対照群、n=10)、破線はHGF 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与群(n=5)、実線はHGF 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与群(n=5)を示す。図3に示されるように、HGFの投与により生存率が向上し、特にHGF 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与群においては死亡例は認められなかつ

※た。

## 【0030】試験B

HGF投与又は非投与下において、DMNを投与したラット肝臓のタイプIコラーゲン沈着(組織所見)を調べた。即ち、線維化基質の検出のために、図3に示した試験において42日目にラットを殺し肝臓を採取した。コラーゲンの免疫蛍光染色には、肝臓をOTC化合物のなかですばやく凍結し、作成した切片はウサギ由来抗ラットコラーゲンタイプI抗体(LSL社製)、そして蛍光標識化ヤギ由来抗ウサギIgG抗体と反応させた後、標本の写真撮影を行った。その結果を図4に示す。図4に示されるように、肝臓におけるタイプIコラーゲンの沈着には有意な違いがあった。生理食塩液投与群の対照ラットでは、タイプIコラーゲンの肝臓での沈着は明瞭であり、血管や肝細胞周囲に太い或いは細いタイプIコラーゲン線維の束が広範に集積していた。これらの所見はHGFの投与によって用量依存的に消失し、また小葉構造の改善はHGF投与群においてより顕著であった。このように、HGFの肝線維化防止効果は肝臓切片の組織

所見から明らかになった。

#### 【0031】試験C

HGF投与による、プロトロンビン時間、肝細胞逸脱酵素及び肝ヒドロキシプロリン含量の変化を調べた。即ち、ラットは図3で示した実験計画に従い処置した。プロトロンビン時間 (PT)、アルブミン (Alb)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) 及びアルカリフォスファターゼ (ALP) の血清 (血漿) 中の値、並びに肝ヒドロキシプロリン含量 (HYP) は、健常ラット群 (n=5、表4において健常ラットと表示)、DMN処理を5週間し生理食塩液のみを投与した群 (n=5、表4において5Wと表示)、DM

10

\*

表4

		PT (sec.)	Alb (mg/dl)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP (IU/L)	HYP (μg/g Liver)
健常ラット	(n=5)	14.2 ± 2.7	4.5 ± 0.04	76 ± 16	19 ± 3	459.6 ± 65	224 ± 89
生理食塩液	5W (n=5)	—	—	314 ± 71	132 ± 16	1967 ± 236	740 ± 211
	5W (n=1)	80<	2.6	162	49	1288	1011
H G F	50 (n=3)	32.0 ± 11.2	2.6 ± 0.8	165 ± 38	42 ± 14	1081 ± 523	789 ± 58
	200 (n=5)	21.4 ± 5.2	3.1 ± 0.7	164 ± 38	40 ± 12	1053 ± 448	665 ± 116

#### 【0033】実施例4

DMN肝線維化ラットでのHGF投与による肝線維減少効果

方法

5週齢のSD系雄性ラットに、DMNを10μl/kgの用量で週3回 (月、火、水) 4週間腹腔内投与し肝線維化ラットを作製した。このラットに1mg/kgのHGF又は1ml/kgの溶媒 (HSA 2.5mg/ml、ツイーン80 0.01%を含むリン酸緩衝生理食塩水) を週5回 (月、火、水、木、金) DMN投与開始時より投与し、4週目の4日目まで投与した。4週目の5日目にラットを屠殺、肝臓を採取後中性ホルマリンに固定し、切片作製後に線維組織を染め分けるマッソントリクローム染色を施した。なお、比較のために健常ラットの肝臓も同様に染色した。染色した各個体の肝臓組織標本について、画像解析装置 (T. Watanabe et al. Analytical Cellular Pathology 4 (3), 248, 1992) を用い、組織切片の全面積中の線維化した組織の面積を計算して線維化の程度を比較した。なお、解析に用いた個体数は、健常ラット8例、DMN+溶媒投与群 (DMN) 8例、DMN+HGF投与群 (HGF+DMN) については血清中にHGF中和活性の生成した個体を除いた6例であった。

#### 【0034】結果

結果を図5に示した。図中の各点は、健常ラット (n= ※

\* N処理を6週間し生理食塩液のみを投与した群 (n=1、表4において6Wと表示) 又は生理食塩液の代わりにHGFを50μg/kg体重 (n=3、表4において50と表示) と200μg/kg体重 (n=5、表4において200と表示) で投与した群でそれぞれ測定した。その結果を表4に示す。なお、表中、5Wと表示した値は35日目にラットを屠殺して得た値であり、これ以外の値はDMN処置開始後42日目にラットを屠殺し得たものである。表4に示されるように、HGFの投与により、肝臓の線維化及び肝機能不全の緩和が図られていることが判明した。

#### 【0032】

#### 【表4】

※8)、DMN投与ラット (n=8)、DMN+HGF投与ラット (n=6) の各個体肝臓の線維組織の割合をパーセントで示したものである。また、横線のバーは平均値を示す。図5に示されるように、健常ラットと比較すると、DMNでは肝臓組織中の線維組織の割合が、平均1.3%に対して7.3%に増加した。これに対してDMN+HGFでは2.8%に低下し、HGFの投与によってDMNによる肝線維化軽減が示された。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2の試験Aにおける、GOT、GPT及びγ-GTPの測定結果を示す図である。

【図2】実施例2の試験Bにおける、GOT、GPT、ヘパラスチンテスト及び肝臓Hyp (ヒドロキシプロリン) 含量の測定結果を示す図である。

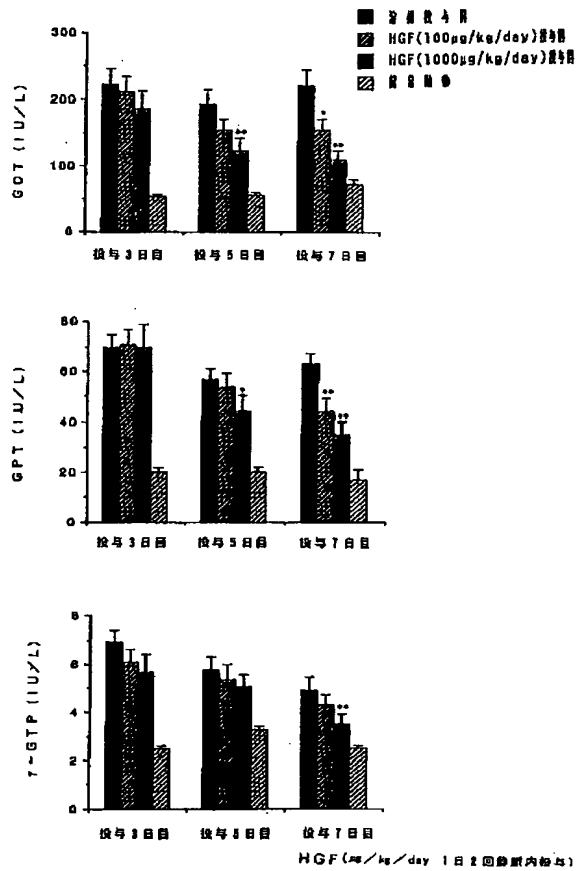
【図3】実施例3の試験Aにおける、肝線維化ラットに対するHGFの延命効果を示す図である。図3において、点線は生理食塩液投与群 (対照群、n=10)、破線はHGF50μg/kg体重投与群 (n=5)、実線はHGF200μg/kg体重投与群 (n=5) を示す。

【図4】実施例3の試験Bにおける、肝線維化ラットに対するHGFの肝線維化軽減効果を示す写真 (生物の形態) である。

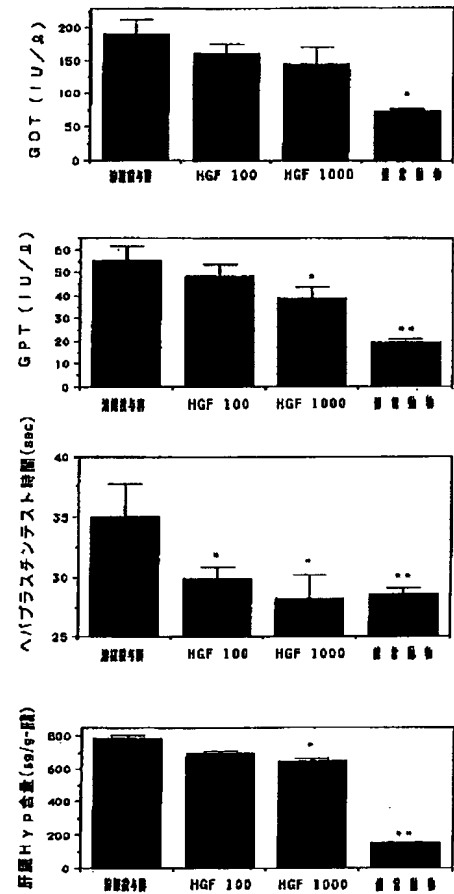
【図5】実施例4における、各個体肝臓の線維組織の割合 (%) を示す図である。



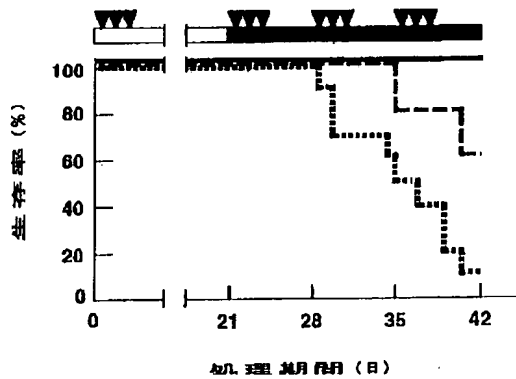
【図1】



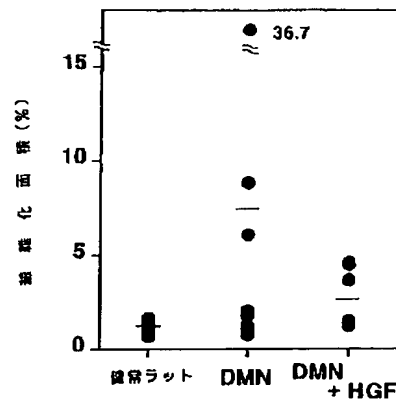
【図2】



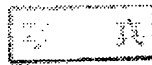
【図3】



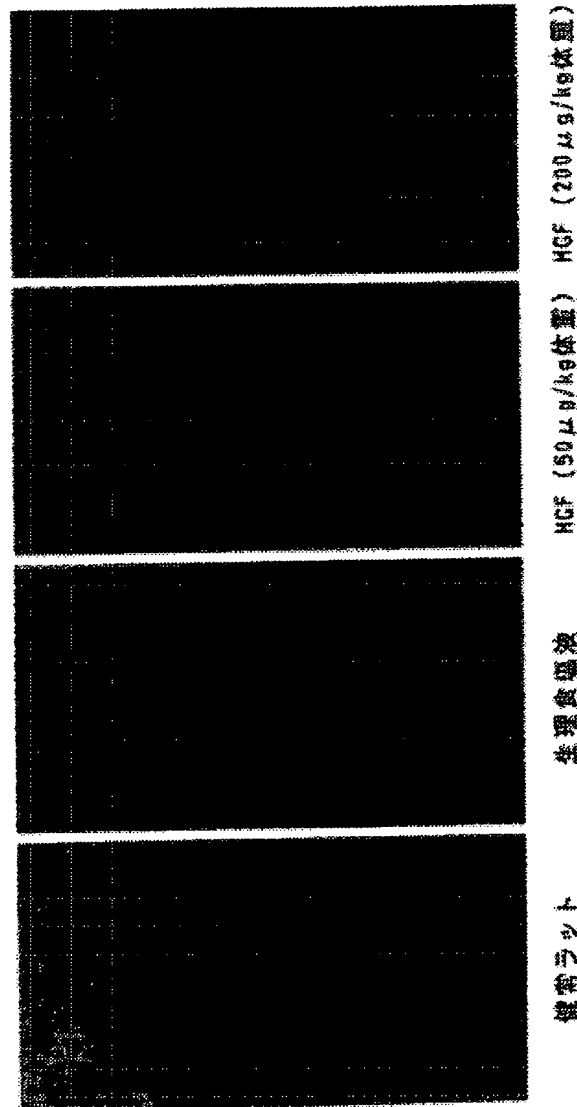
【図5】



【図4】



図面代用写真



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
A 6 1 K 38/22識別記号  
ACS  
ACV  
ADA

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 K 1/16  
14/528318-4H  
8318-4H

A 6 1 K 37/24

ACD  
ACS

ACV

ADA

(72)発明者 塩田 明  
栃木県下都賀郡岩舟町静和544-5

(72)発明者 藤瀬 暢彰  
栃木県下都賀郡石橋町石橋223-2 石橋  
ハイツ201号  
(72)発明者 並木 充夫  
兵庫県宝塚市桜ヶ丘1番12号